

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 38—41, Januar 1969

Amylasebestimmung

Von K. LAUBER

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Bern (Direktor: Prof. Dr. H. Aepli)

(Eingegangen am 20. September 1968)

Eine Methode zur Bestimmung der Amylase in biologischem Material wird beschrieben und diskutiert. Als Substrat dient Amylose in Phosphatpuffer. Vom Inkubat werden 1, 2 und 3 Min. nach Zusatz des Untersuchungsgutes zum Substrat Proben entnommen, mit formamid-haltiger Jodlösung gemischt und unverzüglich bei 660 nm photometriert. Aus der mittleren Extinktionsabnahme pro Min. wird mit einem empirisch bestimmten Konversionsfaktor die Enzymaktivität berechnet (Amylase-Einheiten nach SMITH und ROE (1)). Anhand von 100 Blutspendern ist ein Normalbereich für Serum ermittelt worden.

The measurement of amylase activity

A method for the determination of amylase in biological material is described and discussed. The substrate is amylose in phosphate buffer. At 1, 2 and 3 min. after the addition of test material to the substrate, samples are taken, mixed with formamide-containing iodine solution, and the extinction at 660 nm measured immediately. The enzyme activity (amylase units of SMITH and ROE (1)) is determined from the average decrease in extinction per min. with the aid of an empirically determined conversion factor. A normal range determined on 100 serum samples is reported.

Die zur Zeit gebräuchlichen quantitativen Methoden zur Bestimmung der Amylaseaktivität arbeiten nach dem „Zweipunktprinzip“: Zwei Stärkeproben A und B werden mit dem Untersuchungsgut gemischt. Die Probe B wird sofort mit Säure versetzt, A wird 10 bis 30 Min. inkubiert. Nach Zusatz von Jod werden die Extinktionen E_A und E_B gemessen. Zur Berechnung der Enzymeinheiten wird die relative Extinktionsdifferenz $\frac{E_B - E_A}{E_B}$ je nach Methode und Definition der Einheit mit einem bestimmten Faktor multipliziert. Diese Verfahren haben folgende Nachteile:

1. Bei „Zweipunktmethode“ ist eine lineare Extinktionsabnahme während der ganzen Inkubationszeit nicht ohne weiteres gewährleistet.
2. Der Absolutwert von E_B ist für die Berechnung entscheidend, d. h. die zugesetzte Stärkemenge muß genau bekannt sein (genaue Einwägen, stets frische Lösungen).
3. Wartezeiten während einer Analyse wirken sich vor allem bei Einzelbestimmungen ungünstig auf den Routinebetrieb aus. Sie können nicht ohne weiteres als gewonnene Arbeitszeit betrachtet werden.

Die Methode, welche all diese Nachteile ausschalten würde, wäre die kinetische Bestimmung (direkte Verfolgung einer Extinktionsänderung mit Schreibgerät während der Inkubation). Die blaue Jodstärke als Substrat zu verwenden, ist nicht möglich, da die Amylase durch Jod inaktiviert wird. Versuche, die Hydrolyse der Stärke mit einem optischen Test nach Warburg zu koppeln, verliefen unbefriedigend (Stärke

$$\text{Amylase} \rightarrow \text{Maltose} \xrightarrow{\text{Maltase}} \text{Glucose} \xrightarrow[\text{ATP}]{\text{Hexokinase}} \text{Glucose-6-Phosphat} \xrightarrow[\text{NADP}]{\text{G-6-PDH}} \text{6-Phosphogluconolacton}$$

Die Geschwindigkeit für die Bildung der Di- und Monosaccharide nimmt während der Inkubation zu, weil das Stärkemolekül nicht nur von den Kettenenden

her abgebaut wird. Die Extinktionszunahme infolge Bildung von NADPH erfolgt somit nicht linear mit der Zeit sondern beschleunigt. Um einheitliche Meßbedingungen zu bekommen, müßte bei jeder Messung auf t_{ga} zur Zeit t_0 (Zusatz der Stärke zur vorinkubierten Probe) extrapoliert werden. Dies ist für den einfachen Routinebetrieb zu umständlich. Die Methode wäre zudem auf 5 teure und leicht verderbliche Hilfs-substanzen angewiesen. Im folgenden wird eine Methode beschrieben, die nach dem amyloplastischen Verfahren eine Amylasebestimmung in etwa 4 Min. erlaubt.

Methodik

Reagenzien

1. Phosphatpuffer 0,1M pH 7,0: 4,0 g KH_2PO_4 + 12,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 5 g NaCl mit Wasser ad 1000 ml (wenn aufgekocht und gut verschlossen aufbewahrt, mehrere Monate haltbar).
2. Natronlauge etwa 0,01N.
3. Substratlösung: Etwa 15 mg Amylose (Merck) in einem Gläschen mit einem Tropfen Alkohol befeuchten, mit 2 ml 0,01N NaOH übergießen und bis zur vollständigen Auflösung zum Sieden erhitzen; 100 ml Puffer ① zugeben und filtrieren (bei 4° etwa eine Woche haltbar. Die Amylose braucht nicht jedesmal abgewogen zu werden. Sie wird mit einem Löffelchen abgemessen, das man sich aus einem Stück Plastik durch Einbohren einer Vertiefung selbst herstellt. Die Bohrung wird solange vergrößert, bis der mit einem Spatel glattgestrichene Löffelinhalt Amylose 14—16 mg wiegt).
4. Jodlösung: 2 g Jod + 5 g Kaliumjodid in 10—20 ml Wasser auflösen und dann mit Wasser ad 1000 ml auffüllen (unbeschränkt haltbar).
5. Formamid p. a.
6. „Stop- und Farbreagenz“: Lösungen ④ und ⑤ kurz vor Gebrauch im Volumenverhältnis 3:2 mischen (einige Std. haltbar).

Geräte

1. Spritzen mit einstellbarem Kolbenanschlag zur genauen Abmessung von 0,5 bzw. 2 ml. Die Reproduzierbarkeit der beiden Volumina sollte besser sein als 0,5%. Die 0,5 ml-Spritze soll keine

Feder für die Kolbenrückführung und ein möglichst kleines Totvolumen besitzen.

2. Thermostatisiertes Wasserbad (37°).

3. Photometer (Meßwellenlänge 660 nm).

Arbeitsweise

Für jede Analyse wird ein kleines Reagenzglas mit 3 ml Substratlösung ③ beschickt und 5 Min. im Wasserbad (37°) vorgewärmt. Unterdessen wird eine Meßküvette mit 2 ml Stop-Reagenz ⑥ gefüllt und ins Photometer gesetzt (Spritze verwenden). 0,1 ml Untersuchungsmaterial wird mit der vorgewärmten Substratprobe gemischt. Gleichzeitig wird die Stopuhr laufen gelassen. Mit der Inkubatspritze wird eine erste Probe von 0,5 ml entnommen und mit dem Küvetteninhalt vermischt. Die Küvette wird sofort wieder leergesaugt. Damit werden Spritze und Küvette mit den Meßlösungen vorgespült. Die Küvette wird erneut mit 2 ml Stop-Reagenz beschickt. Etwa 55 Sek. nach Start der Uhr wird 0,5 ml Inkubat aufgezogen und genau bei $t = 60$ Sek. in scharfem Strahl in die Meßküvette gespritzt. Mit einem Plastikstäbchen wird gründlich durchgerührt. Bei $t = 90$ Sek. wird bei 660 nm die Extinktion abgelesen. Bei $t = 120$ und 180 Sek. (allenfalls noch bei 240 Sek.) wird eine weitere Probe von 0,5 ml Inkubat aus dem gleichen Gläschen entnommen und in gleicher Weise gemessen. Fällt die Extinktion um mehr als 0,12 pro Min., muß die Meßreihe mit verdünntem Untersuchungsmaterial wiederholt werden.

Berechnung der Enzymaktivität A (Einheiten nach SMITH und ROE) für Serum: $A = \Delta E/\text{Min.} \cdot 2000$

für Urin und andere eiweißarme Medien: $A = \Delta E/\text{Min.} \cdot 1800$.

Diskussion

Wahl des Substrates

Stärke ist als Naturprodukt von wechselnder Zusammensetzung und wird denn auch je nach Herkunft verschieden rasch von Amylase abgebaut (2). Wesentlich einheitlicher ist eine Fraktion der natürlichen Stärke, die Amylose. So konnte z. B. die von STREET (2) gefundene prozentuale Extinktion des Jod-Amylosekomplexes mit der von uns verwendeten Amylose auf weniger als 2% genau reproduziert werden ($a = 238$). Für die Jodsättigung der Amylose (maximale Extinktion des Jodkomplexes) ist ein Verhältnis von mindestens 2,5 mg Jod auf 1 mg Amylose erforderlich. Auch diese Feststellung von STREET konnte bestätigt werden. Bei der von uns untersuchten Stärke (Riedel de Haen) ist das entsprechende Verhältnis etwa 10mal größer. Bei so hohen Jodkonzentrationen wirkt sich aber die Extinktion des $KJ \cdot J_2$ -Komplexes störend auf die Messung aus. Ein Vorteil der hier beschriebenen Methode besteht darin, daß die genaue Ausgangskonzentration der Amylose und somit die Extinktion E_0 des Amylose-Jod-Komplexes vor Beginn der Hydrolyse nicht bekannt zu sein braucht. Die Enzymaktivität läßt sich mit einem konstanten Umrechnungsfaktor aus der Extinktionsabnahme pro Min. berechnen, aber nur, wenn das Substrat mit Jod gesättigt ist. Die relative Extinktionsabnahme pro Min. $\left(\frac{\Delta E/\text{Min.}}{E_0}\right)$ ist bei gleicher Enzymaktivität unter günstigsten Meßbedingungen bei der Amylose etwa dreimal größer als bei Stärke, was eine dreimal höhere Empfindlichkeit bedingt. Die Vorzüge der Amylose vor der Stärke sind somit evident.

Wahl der Meßwellenlänge

Das Extinktionsmaximum des Jod-Amylose-Komplexes liegt um 620 nm. Bei Messungen nach der oben angegebenen Methode bei 620 nm war ΔE für die erste Min. regelmäßig signifikant kleiner als für die folgenden. Mit einer größeren Menge Inkubat wurde dann alle 2 Min. zwischen 500 und 700 nm ein Spektrum aufgenommen. Abbildung 1 zeigt, daß sich das Ab-

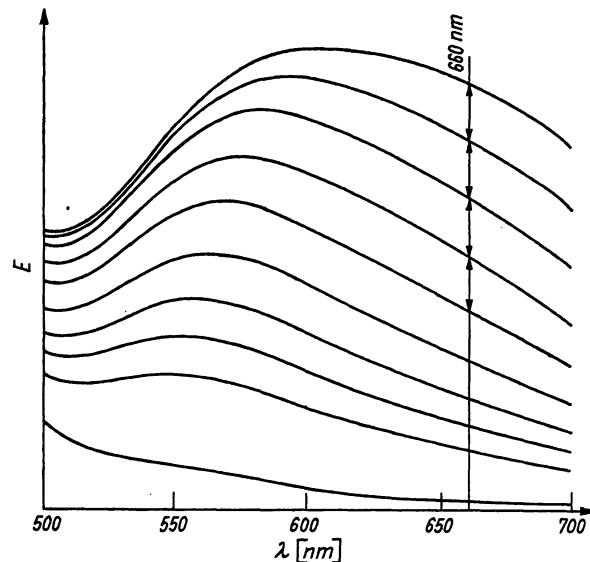


Abb. 1

Änderung des Absorptionsspektrums des Amylose-Jod-Komplexes im Verlauf der Inkubation mit Amylase. Oberste Kurve: 1 Min. nach Inkubationsbeginn; 2 Min. Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Kurven; unterste Kurve: Nach vollständigem Abbau des Substrats

sorptionsmaximum des Jodkomplexes mit zunehmender Dextrinisierung nach kleinerer Wellenlänge verschiebt. Das hat zur Folge, daß einerseits die Extinktion trotz Substratsättigung im allgemeinen nicht linear mit der Zeit abnimmt und andererseits die relative Extinktionsabnahme pro Min. stark von λ abhängig ist. Beträgt $\frac{\Delta E/\text{Min.}}{E_0}$ z. B. für 700 nm 16%, so ist sie für 660 nm 12,8%, für 620 nm 7,7% und für 580 nm noch 2,8% (für den Beginn der Hydrolyse). 660 nm ist für die Messung optimal, weil $\Delta E/\text{Min.}$ vom Start der Reaktion bis zum Abfall auf weniger als die Hälfte der Ausgangsextinktion praktisch konstant bleibt. Wegen der hohen Anfangsextinktion der Meßlösung (etwa 0,7) empfiehlt es sich, bei Photometern ohne Skalendeckung gegen eine Vergleichsküvette mit einer Extinktion von 0,3–0,4 (z. B. 2,5proz. Lösung von $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) abzulesen.

Abstoppen der Enzymreaktion, Farbkomplexbildung

Das Funktionieren der beschriebenen Methode ist nur gewährleistet, wenn mit einem Reagenz sowohl die Enzymreaktion gestoppt als auch der Farbkomplex mit dem restlichen Substrat gebildet wird. Soll die Extinktionsmessung unmittelbar nach der Probeentnahme gemacht werden, muß die Jodkomplexbildung nach wenigen Sek. abgeschlossen sein. Üblicherweise wird die Amylase durch Säurezusatz inaktiviert. Beim Mischen

des Inkubats mit saurer Jodlösung bildet sich aber eine rasch zunehmende Trübung, welche die Photometrie unmöglich macht. Als Hilfsmittel zur Verhinderung der Trübungsbildung hat sich Formamid dank seiner außerordentlichen Lösefähigkeit als gut brauchbar erwiesen. Bei Verwendung einer Jodlösung mit 40% (v/v) Formamid als Stop- und Farbreagenz bleibt die Trübung aus. Ein Säurezusatz erübrigt sich außerdem, weil die hohe Formamidkonzentration die Amylasewirkung vollständig hemmt. Die Bildung des Jod-Amylosekomplexes ist nach weniger als $\frac{1}{2}$ Min. beendet. Wird die oben angegebene Jodlösung statt mit Formamid in gleichem Verhältnis mit Wasser gemischt und als Stop-Reagenz verwendet, so wird die Enzymreaktion wohl hinreichend schnell blockiert, die Farbstoffbildung geht aber langsamer vonstatten. In der Zeit $\frac{1}{2}$ – $2\frac{1}{2}$ Min. nach Reagenzzusatz wurde ein ΔE von $+0,03$ – $0,05$ beobachtet, während bei Formamidzusatz höchstens $+0,005$ erreicht wurde.

Linearität der Enzymreaktion und Substratsättigung

Aus Abbildung 1 geht hervor, daß bei 660 nm $\Delta E/\text{Min.}$ konstant bleibt, bis die Extinktion auf etwas weniger als die Hälfte des Ausgangswertes abgefallen ist. Bei Messungen nach der angegebenen Methode ist E_0 etwa 0,7. Bei $\Delta E/\text{Min.} < 0,12$ ist somit für die ersten 3 Min. linearer Reaktionsverlauf gewährleistet. Daß für die Enzymaktivitäten in diesem Bereich unter den angegebenen Bedingungen Substratsättigung besteht, wurde wie folgt bewiesen: Einem Serum wurde etwas Speichel zugesetzt. Das Serum wurde dann im Verhältnis 3:1; 2:2 und 1:3 mit 0,9proz. NaCl-Lösung verdünnt. Die vier Lösungen ergaben folgende Werte für ΔE zwischen $t = 30$ und $t = 90$ Sek.: 0,230; 0,173; 0,116 und 0,059. Der lineare Abfall innerhalb der 4 Zahlen spricht dafür, daß auch beim unverdünnten Serum für die erste Meßminute Substratsättigung besteht.

Meßgenauigkeit

Eine photometrische Enzymbestimmung, bei der nicht die Bildung eines Produktes sondern das Verschwinden des Substrates verfolgt wird, hat von vornherein einen

Nachteil: Das allmähliche Aufhellen einer starken Farbe läßt sich viel weniger genau registrieren als die Neubildung eines Farbstoffes, vor allem dann, wenn die Meßlösung jedesmal durch Mischen von Inkubat und Farbreagenz hergestellt werden muß. Der relative Volumenmeßfehler beim Mischen sollte mindestens eine Größenordnung kleiner sein als die relative Extinktionsdifferenz $\Delta E/E$ zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messungen. Soll andererseits für die drei ersten Min. Substratsättigung und linearer Extinktionsabfall gewährleistet sein, so darf $\frac{\Delta E/\text{Min.}}{E_0}$ den Wert von 0,2 nicht überschreiten. Damit auch Seren mit leicht erhöhter Aktivität ohne Vorverdünnen direkt analysiert werden können, sollte $\frac{\Delta E/\text{Min.}}{E_0}$ im Mittel etwa 0,05 werden. Dieses Erfordernis ist bei der Arbeitsvorschrift berücksichtigt. Bei einem tolerierbaren Meßfehler von höchstens $\pm 10\%$ darf die Summe der Pipettierfehler $\pm 0,5\%$ nicht überschreiten. Ähnliche Überlegungen gelten übrigens auch für jede amyloklastische „Zweipunktmethode“. Mit den von uns verwendeten Glasspritzen mit aufgesetzter Chromstahlnadel und einstellbarem Kolbenanschlag wurde für 15 gleiche Mischansätze Substrat/Stopreagenz eine Standardabweichung der Extinktion von weniger als $\pm 0,2\%$ erreicht.

Berechnung der Enzymeinheiten

Die Hydrolyse der Substratmoleküle hat nicht nur eine Extinktionsabnahme zur Folge, sondern auch eine gleichzeitige Farbverschiebung. Die Berechnung einer internationalen Enzymeinheit ($\mu\text{„Mol“}$ gespaltene Glucosidbindungen pro Min.) aus der relativen Extinktionsabnahme hätte somit nur fiktiven Charakter.

Die starke Abhängigkeit des Quotienten $\frac{\Delta E/\text{Min.}}{E_0}$ von der Wellenlänge (vgl. Abb. 1) macht es auch problematisch, die pro Zeiteinheit abgebaute Menge Amylose zu berechnen. Wir erachten es daher als angezeigt, die seit langem gebräuchliche Enzymeinheit von SMITH und ROE (1), die auch von PIMSTONE (3) verwendet und empfohlen wird, beizubehalten (Abbau

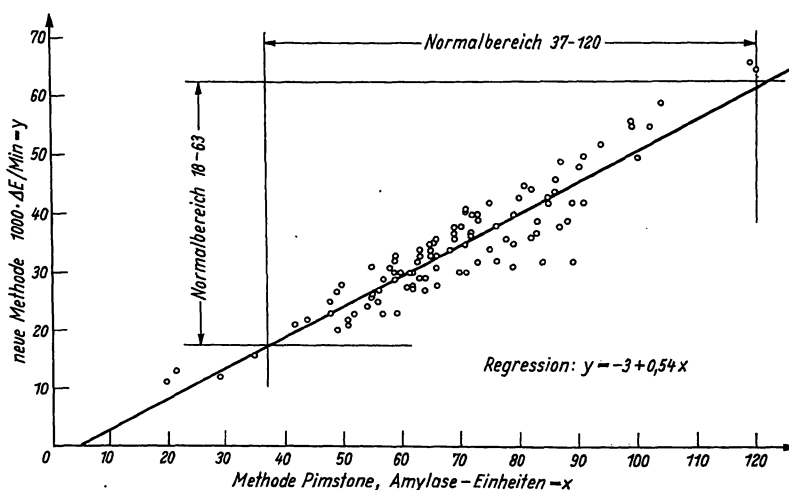


Abb. 2

Amylasebestimmung bei 100 Blutspendern; Korrelation zwischen der hier diskutierten und der Methode nach Pimstone mit Regressionsgerade und Normalbereich

von 10 mg Stärke durch 100 ml Serum in 30 Min. bei $37^\circ = 1\text{E}$). 100 Blutspenderseren wurden nach der hier beschriebenen und der Methode von PIMSTONE analysiert. Abbildung 2 zeigt die Korrelation der beiden Verfahren. Für die Regressionsgerade ergibt sich umgeformt: $x = 1850 \cdot y + 5,5$ (x = Einheiten nach SMITH und ROE; $y = \Delta\text{E}/\text{Min.}$). Der Quotient der beiden Mittelwerte \bar{x}/\bar{y} ergab 2000. Für den Routinebetrieb darf vereinfachend mit dieser Zahl als Umrechnungsfaktor gearbeitet werden. Im mittleren Normalbereich stimmt dann das Ergebnis mit der korrekten Berechnung aus der Regression überein. Für das höchste noch zulässige $\Delta\text{E}/\text{Min.}$ (0,12) wird die Abweichung maximal 5%.

Übereinstimmend mit der Feststellung von PIMSTONE (3) wurde gefunden, daß auch bei Verwendung von Amylose und Formamid die Farbintensität des Jodkomplexes durch die Gegenwart von Eiweiß vermindert wird. Bei 30 untersuchten Seren ergab sich gegenüber Wasser eine Extinktion von $91 \pm 3\%$. (Die Seren wurden nach obiger Methode analysiert und die Extinktion auf die Zeit t_0 extrapoliert.) Die Herabsetzung

der Extinktion durch Eiweiß ist somit etwas geringer als die von PIMSTONE gefundene (15%), muß aber bei der Aktivitätsberechnung für eiweißarmes Untersuchungsmaterial (Urin, Sekret) berücksichtigt werden (Serum: $E = \Delta\text{E}/\text{Min} \cdot 2000$; Urin: $E = \Delta\text{E}/\text{Min} \cdot 1800$).

Normalbereich

100 Spenderseren wurden nach der oben beschriebenen und der Methode von PIMSTONE (3) untersucht. Die Aufzeichnung der kumulativen prozentualen Häufigkeit ergab für beide Methoden eine eindeutig log-normale Verteilung. Für die Methode PIMSTONE errechnete sich aus den Logarithmen sämtlicher Einzelwerte ein Normalbereich von 37–120 E. Für die neue Methode wurde der entsprechende Bereich (in $\Delta\text{E}/\text{Min} \cdot 1000$ ausgedrückt) 17,7–62,7. Nach der Regressionsgleichung umgerechnet entspricht dies 38–121 E. PIMSTONE fand für das von ihm untersuchte Kollektiv (189 Personen) 20–140 E.

Für wertvolle Hilfe beim Methodenvergleich und der Ermittlung des Normalbereichs gebührt Frl. Margrit MEIER besonderer Dank.

Literatur

1. SMITH, B. W. und J. H. ROE, J. biol. Chemistry 179, 53 (1949).
2. STREET, H. V. und J. R. CLOSE, Clin. chim. Acta Amsterdam 1, 256 (1956).
3. PIMSTONE, N. R., Clin. Chemistry New York 10, 891 (1964).

Dr. chem. K. Lauber
Medizinisch-chemisches Institut der Universität
CH 3000 Bern, Buhlstr. 28